AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 69, №1, səh. 5-11 (2014)

Исследование RAPD-Профилей ДНК У Растений, Выросших При Воздействии Хронической Ионизирующей Радиации

К.Г. Гасымова*, С.Ю. Сулейманов, А.Ч. Маммадов, И.М. Гусейнова, Д.А.Алиев

Институт ботаники НАНА, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ1073, Азербайджан;
**E-mail:konulbayramova29@gmail.com*

Проведен RAPD-анализ геномной ДНК растений парнолистник обыкновенный (*Zygophyllum fabago*), тростник обыкновенный (*Phragmites australis*) и лох каспийский (*Eleagnus caspica*), подвергнутых хроническому радиационному излучению, и растений, выросших в условиях естественной фоновой радиации. При амплификации ДНК образца растения *Zygophyllum fabago* с использованием праймера OPC-08 показано, что под воздействием облучения происходит усиление интенсивности полосы в области 1700 bp. При этом локус, присутствующий в области 520 bp в контрольном образце, во время стресса не выявляется. В результате анализа, проведённого с использованием праймеров OPC-08, OPH-14 и OPH-01 амплификация новых специфических локусов у *Phragmites australis* отмечена в области 1200 bp (OPC-08), 850 bp (OPH-14) и 700 bp (OPH-01). При использовании праймера OPC-08 у растения *Eleagnus caspica* амплификация нового специфического локуса обнаруживается в области 660 bp. При использовании праймеров OPH-01, OPH-03 и OPH-15 как у нормальных, так и у облучённых образцов *Eleagnus caspica* наблюдалось ослабление интенсивности полос и потеря некоторых фрагментов. Полученные результаты указывают на то, что главные изменения, наблюдаемые в RAPD-профилях, выражаются как в появлении, так и в исчезновении некоторых полос, сопровождающихся также изменением их интенсивности. Эти эффекты могут быть связаны со структурными перестановками в ДНК, вызванными различными типами повреждений под воздействием облучения.

Ключевые слова: *растения, хроническое ионизирующее излучение, RAPD - маркеры, ПЦР*

ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов биохимии, молекулярной биологии и генетической инженерии позволяет подходить к оценке пострадиационного мутационного процесса и радиационно-индуцированной нестабильности генома с точки зрения оценки изменения молекулярно-генетических показателей, таких как одноцепочечные или двухцепочечные разрывы на молекуле ДНК.

Ионизирующая радиация оказывает повреждающий эффект на живые организмы, в частности на геномную ДНК растений. Ускорение технического прогресса значительно увеличило подверженность людей и других организмов действию ионизирующей радиации. С точки зрения аспекта подверженности действию радиации, растения привлекают к себе особое внимание (Jagetia, 2007).

В радиоактивных условиях растения особенно восприимчивы к воздействию хронической радиации, поскольку они неподвижны и неспособны покинуть заражённую зону; таким образом, они не могут избежать вредных воздействий окружающей среды, и вынуждены приспосабливаться к жизни в загрязнённом окружении. Растения являются удобным материалом для изучения молекулярных механизмов приспособления организмов к воздействию радиационного излучения, так как они имеют высокие темпы роста и высокую производительность, а также являются более привлекательными по сравнению с животными, с этической точки зрения (Kovalchuk et al., 2004). Исследование механизмов адаптации растений к ионизирующим воздействиям окружающей среды всё ещё отстаёт от многих других сфер молекулярной биологии растений. Адаптация – это комплексный процесс, при котором популяции организмов отвечают на длительно действующие стрессовые факторы окружающей среды постоянным изменением генов (Dmitrieva, 1996).

Подверженность ионизирующей радиации приводит к образованию реактивных кислородных радикалов, приводящих к цитотоксичным, мутагенным и канцерогенным эффектам (Kim et al., 2003; Kuroda et al., 1999). Главный деструктивный эффект ионизирующей радиации в биологических системах основан на радиолизе воды. Конечным продуктом этого процесса является гидроксильный радикал ($^{\bullet}OH$). Радикал

·OH может легко взаимодействовать с различными типами макромолекул, включая жиры, белки и, в частности, ДНК. Окислительные атаки способствуют различным изменениям ДНК (Roldan-Arjona & Ariza, 2009). В зависимости от дозы облучения и радиочувствительности организмов, повреждения ДНК, вызванные радиацией приводят к геномным или хромосомным аномалиям. ДНК, как правило, считается основным сайтом радиационного повреждения, что объясняет митотическое торможение, индуцированное воздействием радиации. В живых организмах существуют системы проверки клеточного цикла, позволяющие восстанавливать повреждения; однако склонная к ошибкам природа восстановления ДНК может приводить к отклонениям, которые потенциально могут передаваться потомству (Cools & De Veylder, 2009). Определение вариабельности растений на молекулярном уровне, исследование геномных структур и создание геномных карт растений при помощи метода молекулярного маркирования имеет огромное значение для селекции растений (Çimen et al., 2004).

Для выявления повреждений и мутаций ДНК в настоящее время часто применяют метод RAPD (Atienzar et al., 2002). Известно, что ионизирующее излучение вызывает в ДНК разнообразный спектр повреждений. Это одно- и двунитевые разрывы, внутри- и межмолекулярные сшивки ДНК-ДНК, ДНК-белок, повреждения ДНК-мембранного комплекса, оснований, изменения в суперспирализации молекулы ДНК (Danylchenko & Sorochinsky, 2005). О повреждении структур может свидетельствовать увеличение числа разрывов в молекулах ДНК (Абрамов и др., 1992), что приводит к задержке и блокированию репликации и транскрипции, увеличению частоты генных мутаций, злокачественной трансформации, нарушению функций генома (репликации, транскрипции), деградации хромосомы и включению апоптоза и гибели облученных клеток. Важнейшим повреждением первичной структуры ДНК является нарушение целостности ее полинуклеотидных цепей в результате появления однонитевых и парных разрывов. По современным представлениям, парные разрывы летальны для клеток, а однонитевые разрывы, оставаясь нерепарированными, могут приводить к возникновению дополнительных парных разрывов. Ионизирующее излучение не только нарушает целостность полинуклеотидных тяжей, но и воздействует на азотистые основания. Под действием ионизирующего излучения нарушается также и упорядоченная вторичная структура ДНК, что является следствием радиационно-химических повреждений первичной структуры ДНК (Рябченко, 1979). Такие различные типы повреждений ДНК должны выявляться соответствующими изменениями в RAPD-профилях.

Целю данной работы являлось проведение сравнительного анализа RAPD-профилей различных растений, подверженных ионизирующему излучению. Чтобы оценить структурные изменения ДНК после взаимодействия с генотоксичными агентами, нами были использованы RAPD праймеры с единичными заменами нуклеотидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили растения – парнолистник обыкновенный (*Zygophyllum fabago),* тростник обыкновенный *(Phragmite saustralis)* и лох каспийский (*Eleagnus caspica),* распространенные на территории, загрязненной нефтью в посёлке Раманы (Азербайджан), на месте бывшего йодного завода. Были использованы растения, выросшие при фоновой радиации в 250 мкР/ч, а также в естественных условиях (4-8 мкР/ч), и было проведено сравнительное исследование. Дозу излучения радиации измеряли с помошью дозиметра МКС-АТ1125.

В работе были использованы 13 различных декамерных RAPD праймеров (Табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность RAPD праймеров, использованных для амплификации ДНК

Обозначение праймера	Последовательность 5′→3′
OPC-08	TGG ACC GGT G
OPU-06	ACC TTT GCG G
OPC-06	GAA CGG ACT C
OPA-07	GAA ACG GGT G
OPD-02	GGA CCC AAC C
OPH-01	GGT CGG AGA A
OPH-03	AGA CGT CCA C
OPH-14	ACC AGG TTG G
OPH-15	AAT GGC GCA G
OPH-17	CAC TCT CCT C
OPB-08	GTC CAC ACG G
OPE-05	TCA GGG AGG T
OPG-18	GGC TCA TGT G

Выделение растительной геномной ДНК. Геномная ДНК была выделена из замороженной (хранившейся при -80^{0}C) или высушенной в силиконовом геле ткани листа, используя модифицированный метод CTAB (2% сетилметиламмониумбромид; 1% поливинилпирролидон; 10 мМ Трис (pH 8,0); 20 мМ ЭДТА pH 8,0; 1,4 мМ NaCl). Процедура изолирования была изменена с применением тройного экстракта CTAB для получения оптимальных количеств

высококачественной ДНК из тканей со значительным количеством вторичных компонентов, которые встречаются во многих базальных ангиоспермах. Этот протокол является модификацией процедуры описанной в Liang & Hilu (Liang & Hilu, 1996). Около 100 мг сухих тканей растений (эквивалентной приблизительно 300 мг свежей ткани) были помещены в жидкий азот и инкубированы предварительно согретой на водяной бане до 65^0С с 700 мкл CTAB в течение 30 минут. После центрифугирования и перемещения супернатанта в чистую пробирку, эта же ткань была заново инкубирована дважды раствором CTAB. Все три пробы держались отдельно. Затем растворы CTAB были дважды экстрагированы хлороформом, и ДНК была последовательно осаждена этанолом. После раздельного ресуспендирования гранул в результате всех шагов экстрагирования в TE, были выполнены ещё два шага: первый – добавление пол объёма 7,5 М ацетата аммония и осаждение в 100% этаноле, второй – добавление пол объёма 3 М ацетата натрия и осаждение в этаноле. Геномная ДНК из второго и третьего экстрактов обычно получалась в достаточно чистом виде для непосредственного использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Определение концентрации ДНК. После растворения ДНК, концентрация была определена по оптической плотности (OD) при λ = 260 нм с помощью спектрофотометра ULTROSPEC 3300 PRO (“AMERSHAM”, США). Чистота геномной ДНК была определена по отношению поглощений A260/A280. Качество ДНК было проверено по работе образцов экстрагированных ДНК в 0,8% агарозном геле, окрашенном 10 мг/мл этидиум бромидом в 1×TBE (Tris base, Boric acid, EDTA) буфере. Гель был проявлен и сфотографирован в ультрафиолетовом свете с помощью «Gel Documentation System *UVITEK»* (СК).

Амплификация ДНК. Полимеразную цепную реакцию с RAPD-маркерами проводили по методу Williams (Williams et al., 1990). Амплификацию ДНК проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 10 х буфера, 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 0,2 единиц Taq-полимеразы в инкубационном буфере. ПЦР проводили в амплификаторе «Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler» (Сингапур) в следующих условиях: начальная денатурация – 4 мин при 94ºC; далее 35 циклов – 1 мин при 94ºC, 1 мин. отжиг праймеров - 37ºC и 1мин элонгация – 72ºC; далее последний цикл синтеза 10 мин – 72ºC и хранили при 4°C.

Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1,5 % агарозном геле в аппарате для проведения горизонтального электрофореза HR-2025-High Resolution («IBI SCIENTIFIC», США) с добавлением этидиум бромида и документировали с помощью «Gel Documentation System *UVITEK».* Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно 1 kb ДНК маркера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе был проведён сравнительный ПЦР-анализ ДНК растений с использованием декамерных RAPD праймеров, подвергнутых хроническому радиационному излучению интенсивностью 250 мкР/ч, и растений, выросших в условиях естественной фоновой радиации.

При амплификации геномной ДНК образца растения парнолистника обыкновенного (*Zygophyllum fabago)* с использованием праймера OPC-08 были получены интересные результаты. Как отчётливо видно по рисунку 1, под воздействием облучения происходит усиление интенсивности полосы в области 1700 bp. При этом локус, присутствующий в контрольном образце в области 520 bp, в стрессовом образце не выявляется. В результате же использования праймера OPC-06, локусы, находящиеся в области 1200 и 540 bp, наблюдаются как в контрольных образцах, так и в образцах, подвергнутых стрессу (однако в стрессовых растениях интенсивность полос усилена). Отдельно следует отметить тот факт, что при использовании праймера OPC-06 у облучённого образца происходит амплификация специфического локуса в области 800 bp, чего не наблюдается в контрольном образце. При использовании праймера OPB-08 (Рис.2) у подвергнутого стрессу растения *Z. fabago* происходит снижение синтеза локуса, находящегося в области 500 bp, и усиление синтеза фрагмента, расположенного в области 680 bp, в то время как локус, выявленный у контрольного образца в области 1300 bp, у стрессового образца не наблюдается. При использовании праймера OPH-03 (Рис.1) как у контрольных, так и у облучённых образцов растения *Zygophyllum fabago* наблюдается синтез многих различающихся фрагментов. Новые локусы синтезируются в области 250, 380, 400 и 1700 bp. При использовании праймера OPH-14 у подвергнутого стрессу образца усиливается интенсивность синтеза некоторых фрагментов, при использовании же праймера OPH-15 (Рис.2) синтез многочисленных фрагментов также усиливается, и в области 1500 bp у облучённых растений *Z. fabago* происходит синтез нового локуса. При анализе с праймером OPD-02 под воздействием стресса усиливается синтез некоторых фрагментов у этого растения.

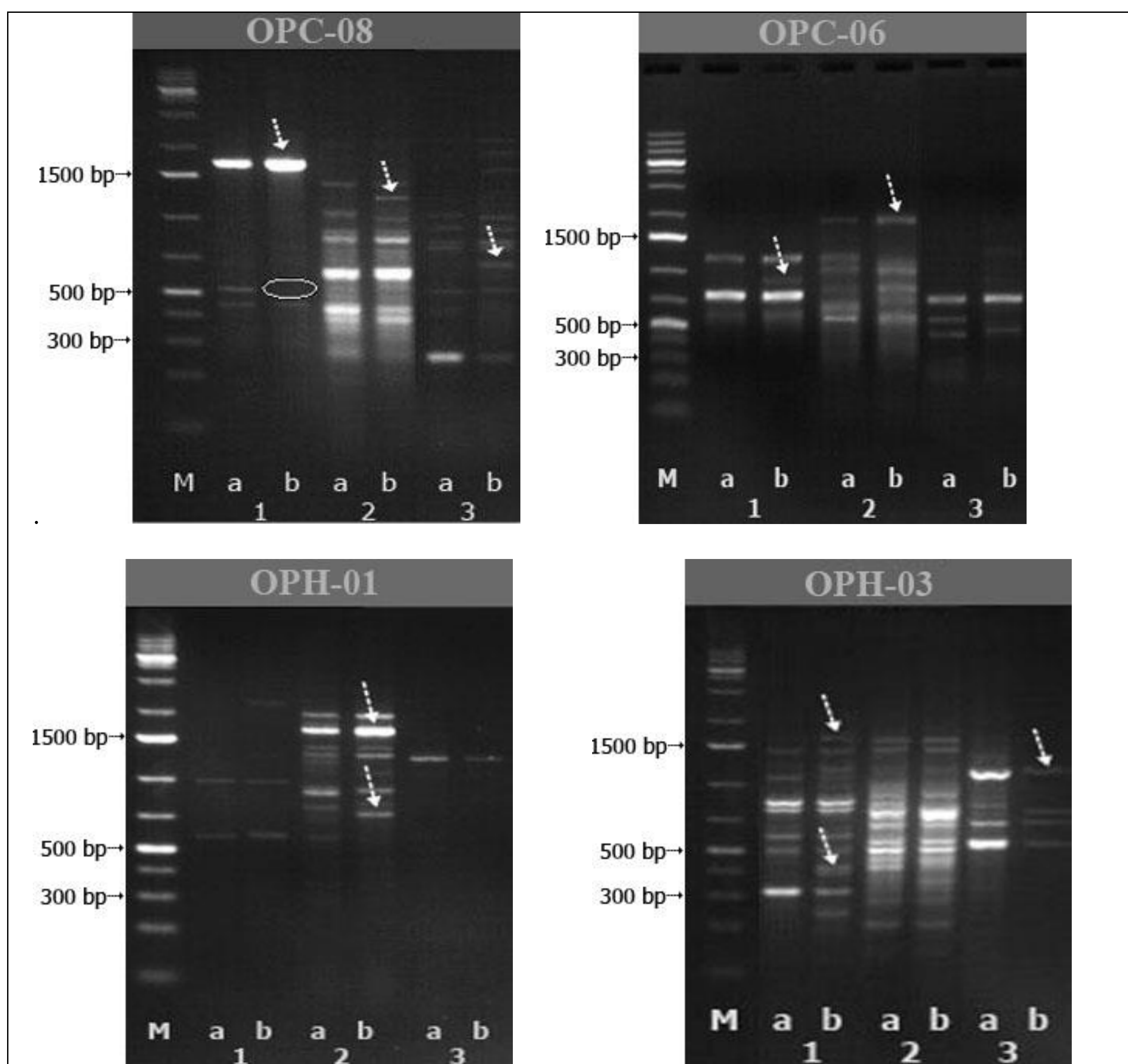


Рис. 1. RAPD-профили растений *Zygophyllum fabago*, *Phragmites australis* и *Eleagnus caspica*, полученные при использовании различных декамерных праймеров (OPC-08, OPC-06, OPH-01, OPH-03). Растения обозначены цифрами 1 (*Zygophyllum fabago*), 2 (*Phragmites australis*) и 3 (*Eleagnus caspica)*, соответственно; a - контрольный вариант, b - стрессовый вариант. Названия использованных в RAPD анализе праймеров указаны над профилями. Стрелка указывает на появление нового фрагмента у стрессового варианта, исчезновение полос обведено кругом. M – 1 kb ДНК-маркер.

В результате анализа, проведённого с использованием праймеров OPC-0 8, OPH-14 и OPH-01, амплификация новых специфических локусов у растений тростника обыкновенного *(Phragmites australis)* отмечена в области 1200 bp (OPC-08), 850 bp (OPH- 14) и 700 bp (OPH-01). А в результате использования праймера OPC-06 (Рис.1) наблюдается синтез различных ампликонов как у растений, выращенных в нормальных условиях, так и у растений, подвергнутых радиации.

Под воздействием облучения происходит усиление интенсивности полосы, расположенной в области 1900 bp. Помимо этого при использовании праймера OPH-01 также наблюдается усиление интенсивности синтезируемого фрагмента в области 1500 bp (Рис.1). У растения *P. australis* под воздействием радиации локусы, расположенные в области 800 bp и 900 bp, не выявлены при использовании OPB-08 маркера.

В то же время, у этого растения наблюдается синтез новых фрагментов в интервале 1000-1500 bp.

Также наблюдалось исчезновение фрагмента в области 2000 bp при использовании праймера OPH-14 (Рис. 2). У подвергнутого стрессу

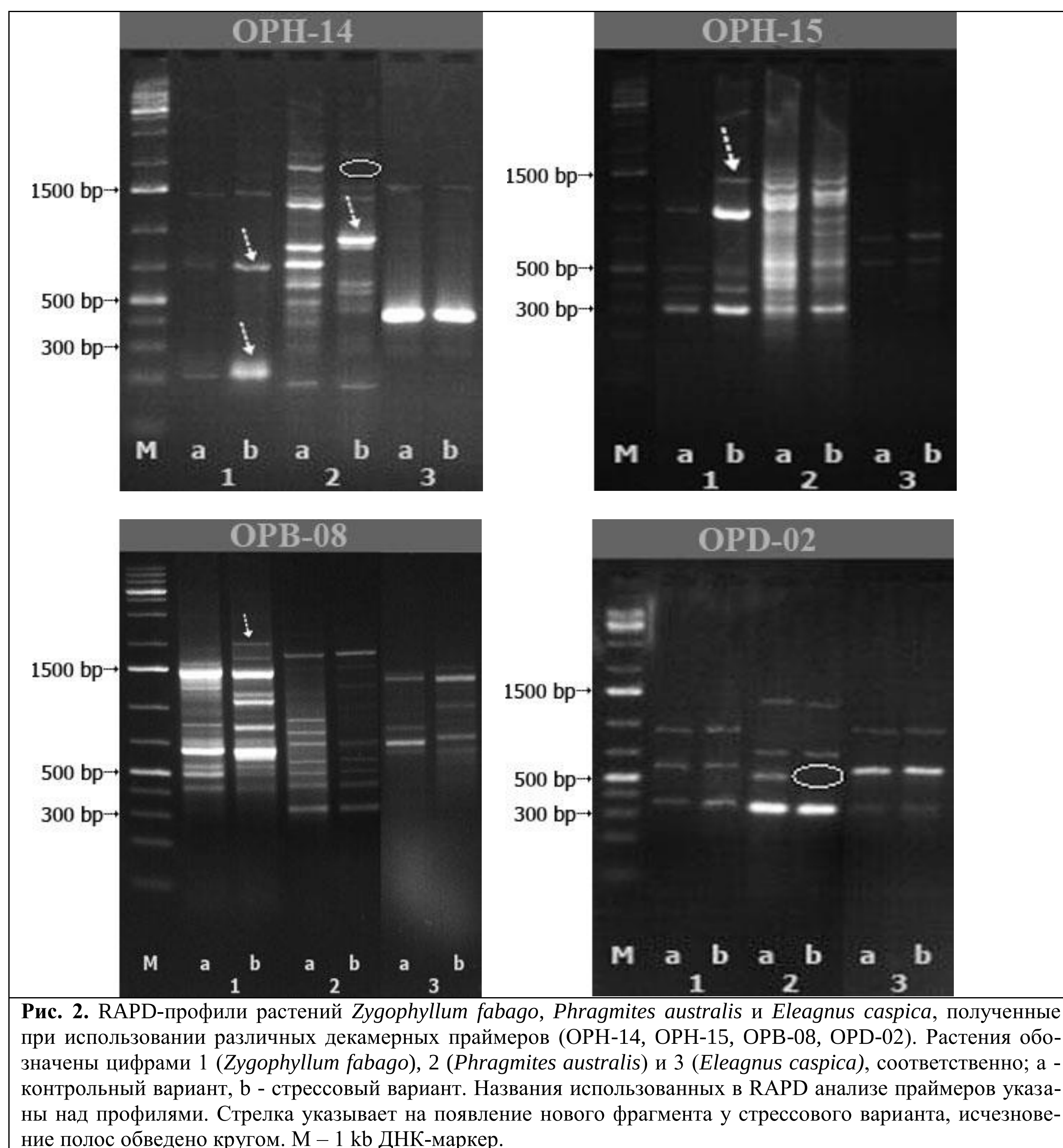


Рис. 2. RAPD-профили растений *Zygophyllum fabago*, *Phragmites australis* и *Eleagnus caspica*, полученные при использовании различных декамерных праймеров (OPH-14, OPH-15, OPB-08, OPD-02). Растения обозначены цифрами 1 (*Zygophyllum fabago*), 2 (*Phragmites australis*) и 3 (*Eleagnus caspica)*, соответственно; a - контрольный вариант, b - стрессовый вариант. Названия использованных в RAPD анализе праймеров указаны над профилями. Стрелка указывает на появление нового фрагмента у стрессового варианта, исчезновение полос обведено кругом. M – 1 kb ДНК-маркер.

растения *P. australis* при использовании праймера OPD-02 локус в области 500 bp, появляющийся у контрольного растения, в стрессовых растениях не наблюдается.

При использовании праймера OPC-08 (Рис.1) у растения лох каспийский (*Eleagnus caspica*) как в контрольных, так и в облучённых образцах наблюдался синтез различных ДНК фрагментов (ампликонов). Амплификация нового специфического локуса наблюдается в области 660 bp. В результате использования праймера OPC-06 (Рис.1) у *E. caspica* наблюдается синтез многочисленных фрагментов. А именно, под воздействием облучения резко увеличилась интенсивность полосы, расположенной в области 700 bp, и наблюдалось ослабление синтеза полос в области 420 и 500 bp. При использовании праймеров OPH-01, OPH-03 и OPH-15 как у нормальных, так и у облучённых образцов наблюдалось ослабление синтеза и потеря некоторых фрагментов.

Было показано, что единичные замены нуклеотидов в декамерных праймерах действительно могут отразиться на амплификации локусов. Главные изменения, наблюдаемые в RAPD-профилях, выражались как в появлении, так и в исчезновении некоторых полос, сопровождающихся изменением их интенсивности. Эти эф-

фекты могут быть связаны с перестановками в структуре ДНК, вызванными различными типами повреждений под воздействием облучения. Изменение интенсивности и исчезновение некоторых полос на RAPD-профилях исследованных растений при использовании различных праймеров может быть связано с уровнем фотопродуктов, которые образуются в образцах ДНК после генотоксичной обработки и могут уменьшить число мест связывания RAPD праймеров. Появление же новых полос может быть объяснено как результат различных структурных изменений ДНК (разрывов, перестановок, удалений) (Danylchenko & Sorochinsky, 2005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абрамов В.И. Сергеева С.А., Птицына С.Н. (1992) Генетическике эффекты и репарация однонитевых разрывов ДНК в популяциях Arabidopsis thaliana, произрастающего в окрестностях Чернобыльской АЭС. Генетика, **28(6):** 69–73.

Рябченко Н.И. (1979) Радиация и ДНК, М: «Атомиздат», 191 с.

Atienzar F., Venier P., Jha A.N, Depledge M.H. (2002) Evaluation of the RAPD assay for detection of DNA damage and mutations. Mut. Res., **521:**151-163.

Jagetia C. G. (2007) Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. J. Clin. Biochem. Nutr., **40(2):**74-81.

Çimen A., Sema A., Leyla A., Yasemin C. (2004) Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L.Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD. Mut. Res., **556:** 35-44.

Cools T., De Veylder L., (2009) DNA stress checkpoint control and plant development. Curr. Opin. Plant Biol., **12:** 23–28.

Danylchenko O., Sorochinsky B. (2005) Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and γ-rays. BMC Plant Biology., 5(Suppl 1):S9 doi:10.1186/1471-2229-5-S1-S9

Dmitrieva S.A. (1996) The adaptation of natural plant populations to chronic irradiation due to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. Tsitol Genet., **30:** 3–8.

Kim S.D., Lee I.S, Hyun D.Y. Jang C.S., Song H.S, Seo Y.W., Lee Y. (2003) Detection of DNA instability induced from tissue culture and irradiation in Oryza sativa L. by RAPD analysis. Journal of Plant Biotechnology, **5:**25–31.

Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O. (2004) Molecular Aspects of Plant Adaptation to Life in the Chernobyl Zone. Plant Physiol., **135(1):** 357–363.

Kuroda S., Yano H., Kogaban Y., Tabei Y., Takaiwa F., Kayano T., Tanaka H. (1999). Identification of DNA polymorphism induced by X-ray and UV irradiation in plant cells. Japan Agricultural Research Quarterly, **33:** 223–226.

Liang H., Hilu K.W. (1996) Application of the matK gene sequences to grass systematics. Can. J. Bot., **74:** 125–134.

Roldàn-Arjona T., Ariza R.R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. Mutat. Res./Rev. Mutat. Res., **681:** 169–179.

Williams J.G., Kubelik K.J., Livak J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res., **18:** 6531-6535.

Xroniki Ionlaşdirici Şüalarin Təsiri Altinda Yetişən Bitkilərdə DNT-nin RAPD-Profillərin Tədqiqi

K.H. Qasımova, S.Y. Süleymanov, Ə.Ç. Məmmədov, İ.M. Hüseynova, C.Ə.Əliyev

AMEA Botanika İnstitutu

Tədqiqat işində ionlaşdırıcı şüalanmaya məruz qalmış və təbii radiasiya fonunda böyüyən bitkilərdən – adi qoşayarpaq (*Zygophyllum fabago)*, adi qamış (*Phragmites australis)* və xəzər iydəsi (*Eleagnus caspica*) genom DNT-si RAPD-markerlərin köməyi ilə analiz edilmişdir. OPC-08 praymerindən istifadə etməklə göstərilmişdir ki, *Zygophyllum fabago* bitkisinin genom DNT-sində şüalanmanın təsirindən 1700 bp sahəsində zolağın intensivliyi artır. Bu zaman kontrol nümunədə 520 bp sahəsində müşahidə olunan lokus, stresə məruz qalmış bitkilərdə aşkar olunmur. *Phragmites australis* bitkisində OPC-08, OPH-14 və OPH-01 praymerlərindən istifadə etməklə aparılan analizin nəticələrinə görə, 1200 bp (OPC-08), 850 bp (OPH-14) və 700 bp (OPH-01) sahələrində yeni spesifik lokuslar müşahidə olunmuşdur. OPC-08 praymeri ilə amplifikasiyası zamanı *Eleagnus caspica* bitkisində 660 bp sahədə yeni spesifik lokus aşkar edilmişdir. OPH-01, OPH-03 və OPH-15 praymerlərindən istifadə zamanı həm normal, həm də şüalanmış nümunələrdə zolaqların intensivliyinin zəifləməsi və yaxud bəzilərinin itməsi baş vermişdir. Alınan nəticələr göstərir ki,

nümunələrin RAPD analizi zamanı müşahidə olunan əsas dəyişikliklər müəyyən zolaqların yaranması yaxud itməsi və ya onların intensivliyinin dəyişməsi ilə müşayiət olunur. Bu effektlər şüalanmanın təsiri ilə baş verən müxtəlif tip zədələnmələrlə baglı DNT-nin quruluşunda olan struktur dəyişmələri ilə izah oluna bilər.

Açar sözlər: *bitki, xroniki ionlaşdırıcı şüalanma, RAPD-markerlər, PZR*

Study of RAPD-Profiles of DNA of Plants Grown Under Chronic Ionizing Radiation

K.H. Gasimova, S.Y. Suleymanov, A.Ch. Mammadov, I.M. Huseynova, J.A.Aliyev

Institute of Botany, ANAS

Comparative RAPD-analysis of DNA of Syrian bean-caper (*Zygophyllum fabago),* common reed *(Phragmites australis)* and oleaster *(Eleagnus caspica*) subjected to radiation and plants grown under natural background radiation was performed. Amplification of genomic DNA sample of *Zygophyllum fabago* using OPC-08 primer caused an increase in the band intensity at 1700 bp. At the same time, locus amplified at 520 bp in the control sample, was not revealed during the stress. As a result of the analysis, using OPC-08, OPH-14 и OPH-01 primers, amplification of the new specific loci in *Phragmites australis* was observed at 1200 bp (OPC-08), 850 bp (OPH -14) and 700 bp (OPH-01). In *Eleagnus caspica* new spesific locus was detected at 660 bp when using OPC-08 primer. The decrease of band intensity and the loss of some fragments were observed using the primers OPH-01, OPH-03 and OPH-15 in control and irradiated samples of *Eleagnus caspica*. Obtained results indicate that, the main changes observed in the RAPD profiles are expressed by both appearance and disappearance of some bands which are also accompanied by alterations in their intensities. These observed patterns might result from the structural rearrangements in DNA caused by different types of DNA damage.

Key words: *plant, chronic ionizing radiation, RAPD-markers, PCR*